ARBEIDSBESKRIVELSE
Institutt for husdyr – og akvakulturvitenskap, UMB

Metodenavn:Non-esterified fatty acids (NEFA)
IHA-nr.:ARB-1169NEFA

---

1. Innledning

Dette er en ACS-ACOD enzymatisk fargemetode for å bestemme frie fettsyrer i plasma og serum. Reagenset fåes kjøpt i kit fra Wako. Metoden er nøyaktig, enkel og rask.

.

2. Analyseprinsipp.

Prøven som inneholder NEFA, behandles med en acyl-CoA syntese(ACS) med innhold av adenosine triphosphate (ATP), magnesium kationer og CoA og danner thiol esters med CoA som acyl-CoA, samt biproduktet adenosine monophosphate (AMP) og pyrophosphate (Ppi). I neste trinn skjer det en oksidasjon ved tilsetting av acyl-CoA oxidase (ACOD) som utvikler hydrogen peroxid. Oksidasjonen fører til dannelsen av 3-methyl-N-ethyl-N-(β-hydroxyethyl)-aniline (MEHA) med 4-aminoantipyrine som danner en purpurrød farge med max absorpsjon ved 550nm. Mengden av NEFA i prøven kan bestemmes ut fra den optimale

tettheten, målt ved 550nm.

ANALYSEREAKSJON

RCOOH + ATP + CoA $\xrightarrow{\text{ACS}}$ Acyl-CoA +AMP+ PPi
(NEFA)

5. Utstyr

Mikropipette: 50ul
Plastrør 5ml
Automatpipetter:1.0,2.0,10.0 og 20.0ml
Vannbad
Wirlmixer
Engangskyvetter
Spektrofotometer

6. Reagenser, kontroll og standard

Det brukes to reagenser som kjøpes i kit fra Houm.
NEFA C nr. 994-75409 fra Wako. Kitet rekker til 50 tester. Må lagres i kjøleskap. Standard følger med kitet. Kontroll er plasma fra ku som vi har tappet selv og oppbevart i -80°C fryser. Prøvene må stå kortest mulig på benken ellers vil NEFA verdien øke.
Til inkubering brukes vannbad med 37°C.

7. Arbeidsbeskrivelse

Løs opp reagens A med 20ml buffer A og reagens B med 10ml buffer B. Snu forsiktig på flaskene og la de stå ca 15min. Reagensene er holdbare i 5dager ved 2-10 °C.(Kjøleskap)

Prøver, standarer, kontroll og blank pipeteres som på skjemaet under, og leses av ved 550nm.

Tilsett:	**Blank**	**Standard**	**Kontroll**	**Prøve**
Prøve	50ul destillert vann	50ul standard	50ul kontroll	Plasma
Farge reagens A	1,0ml	1,0ml	1,0ml	1,0ml
Mixes godt og sett til inkubering i 37° C i 10min				
Farge reagens B	2,0ml	2,0ml	2,0ml	2,0ml
Mix godt og sett til inkubering i 37°C i 10min.				

Ta prøvene ut av vannbadet og la de stå ved romtemperatur i 5min. til avkjøling.Les av på spektrofotometeret

Beregning:

$$\frac{(A_{prøve} - A_{blank})}{A_{standard}} * C_{standard} = C_{prøve}$$

Hvor A =absorbansen ved 550nm
C= NEFA konsentrasjonen

Liniæritet opp til 2mmol/l. Ved høyere konsentrasjon må prøvene fortynnes med destillert vann til 25 % av orginal konsentrasjonen.(1 del plasma + 3deler vann) og prøven må reanalyseres.